

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

CLISTEN FÁTIMA STAFFEN

**IDENTIFICAÇÃO BIOLÓGICA E ADULTERAÇÃO DE
PESCADOS COMERCIALIZADOS EM PEIXARIAS DE
FLORIANÓPOLIS/SC ATRAVÉS DE DNA BARCODING**

**FLORIANÓPOLIS
2015**

Clisten Fátima Staffen

**IDENTIFICAÇÃO BIOLÓGICA E ADULTERAÇÃO DE
PESCADOS COMERCIALIZADOS EM PEIXARIAS DE
FLORIANÓPOLIS/SC ATRAVÉS DE DNA BARCODING**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para
cumprimento da disciplina TCCII
(BIO 7016) do currículo do Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andrea Rita
Marrero

Coorientador: Prof. Dr. Renato
Hajenius Aché de Freitas

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Staffen, Clisten Fátima

IDENTIFICAÇÃO BIOLÓGICA E ADULTERAÇÃO DE PESCADOS
COMERCIALIZADOS EM PEIXARIAS DE FLORIANÓPOLIS/SC ATRAVÉS DE
DNA BARCODING / Clisten Fátima Staffen ; orientador,
Andrea Rita Marrero ; coorientador, Renato Hajenius Aché
de Freitas. - Florianópolis, SC, 2015.

60 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Barcode. 3. Fraudes
comerciais. 4. Genética. 5. Peixes. I. Marrero, Andrea
Rita. II. Freitas, Renato Hajenius Aché de. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. IV. Título.

Clisten Fátima Staffen

**IDENTIFICAÇÃO BIOLÓGICA E DETECÇÃO DE
ADULTERAÇÃO DE PESCADOS COMERCIALIZADOS EM
PEIXARIAS DE FLORIANÓPOLIS/SC ATRAVÉS DE DNA
BARCODING**

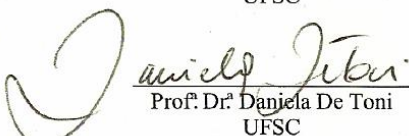
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para o cumprimento da disciplina TCCII (BIO7016) e aprovado em sua forma final pelo Banca Examinadora.

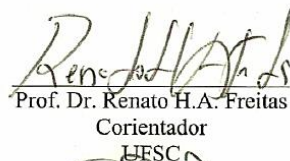
Florianópolis, 26 de junho de 2015.

Prof^ª Dr^ª Maria Risoleta F. Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:


Prof.^ª Dr.^ª Andrea R. Marrero
Orientadora
UFSC


Prof.^ª Dr.^ª Daniela De Toni
UFSC


Prof. Dr. Renato H.A. Freitas
Orientador
UFSC


Prof. Dr. Geison de Souza Izídio
UFSC

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos sinceros a todos que contribuíram para realização deste trabalho, meu imenso carinho e gratidão.

À Universidade Federal de Santa Catarina, a todos os funcionários que colaboraram para minha formação em Ciências Biológicas.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação profissional, compartilhando conhecimento de alguma forma, em qualquer momento durante esta trajetória.

No decorrer de toda minha graduação foram várias as pessoas envolvidas, registro alguns nomes, mas agradeço a todas, pelas oportunidades, ensinamentos, experiências diversas e amizade, vocês foram fundamentais para a minha graduação.

A todos os amigos do LAPOGE, em especial as professoras Dr^a Ilíada Rainha de Souza e Dr^a Yara Costa Netto Muniz, também a Sara, Bibiana, Gabriela e Leili, Mariana, meu muito obrigado por estarem sempre dispostas a ajudar, pela amizade, apoio e por compartilharem várias e boas experiências.

À minha orientadora Dr^a Andrea Rita Marrero, pela grande oportunidade de aprendizado, pela confiança incondicional, dedicação, apoio e incentivo durante este tempo de trabalho juntas. Pelo exemplo como pessoa e como profissional apaixonada pelo que faz, muito obrigada pela sua amizade!

Ao Dr. Renato H. A. de Freitas pela orientação, paciência, conselhos, risadas e colaboração neste trabalho.

Agradeço à banca examinadora, Dr^a Daniela De Toni, Dr. Geison de Souza Izídio e MSc. Leili Hausmann, pela disponibilidade e contribuição neste trabalho,

Aos amigos que conquistei durante a graduação, em especial a Paula, Jéssica Heloisa e Aninha, por todo o apoio, conversas e companheirismo.

Aos amigos que sempre apoiaram e acreditaram em mim.

E acima de todos os agradecimentos, à minha família, pela qual tenho um enorme amor! Aos meus pais, irmãos, sobrinhos e aqueles *in memorian*, pelo carinho, dedicação exemplo e esforço para que eu pudesse lutar pelos meus sonhos e pelo apoio constante mesmo a distância. À Mari, que não é apenas uma super irmã, mas minha melhor amiga, incentivadora dos meus estudos, conselheira, uma pessoa que admiro muito.

Sou eternamente grata a vocês!

*Se os seus sonhos estiverem nas nuvens,
não se preocupe, pois eles estão no lugar certo.
Agora construa os alicerces.*

Shakespeare

RESUMO

A atividade pesqueira no Brasil em 2010 representou 7% do produto interno bruto do agronegócio. Cerca de 20% da produção nacional de pescado industrial está localizada em Santa Catarina no principal polo pesqueiro do país, as cidades de Itajaí e Navegantes. Sendo uma atividade econômica e social importante mundialmente, a pesca tem sofrido um grande desenvolvimento tecnológico, o que gera o aumento das quantidades capturadas de pescado. Esta atividade humana gera um crescente aumento da pressão de uso dos recursos marinhos produzindo alterações em nível maior do que pesquisadores conseguem informações sobre os ecossistemas envolvidos. A correta identificação dos peixes nos seus diferentes estágios de vida e nas diferentes formas de processamento (filés ou postas) contribui para que não ocorram as substituições de espécies tanto acidentais como intencionais. Diante da necessidade de avaliar a correta identificação dos pescados, as informações moleculares podem ser peças chave. Uma das alternativas para a identificação de diversos grupos de vertebrados é a utilização do gene COI – Citocromo Oxidase subunidade I, como um “código de barra” (*Barcode*), a qual já é adotada em diversos países. No Brasil ainda são incipientes as iniciativas que visem atenuar erros de identificação, o que provoca perdas econômicas e ecológicas. Este trabalho objetiva identificar a autenticidade de peixes comercializados no Mercado Público Municipal de Florianópolis/SC. Para isso foram coletadas 82 amostras de filés ou postas dos estabelecimentos comerciais, foi realizada a extração do DNA genômico seguido das reações para o sequenciamento. Destas 82 amostras, 62 foram sequenciadas. Foram detectadas 7 substituições fraudulentas com similaridade igual ou acima de 98%, nas quais espécies de alto valor comercial foram substituídas por espécies de baixo valor comercial, ludibriando os direitos do consumidor. Tais resultados corroboram o Barcode como uma eficiente ferramenta de identificação de espécies, gerando subsídios para ações que visem a sustentabilidade e conservação das espécies bem como para garantir o direito do consumidor.

Palavras-chave: Citocromo Oxidase subunidade I, *Barcode*, Peixe, Fraude, Conservação.

ABSTRACT

In 2010, fishing activity in Brazil was responsible for 7% of the gross national product of Agribusiness. About 20% of industrial fish national production occurs in the main fishing pole of the country in two cities from Santa Catarina: Itajaí and Navegantes. Being a globally important economic and social activity, fishing has been suffering a major technological development generating an increasing number of fish caught. This human activity is responsible for significant growths in marine resource use pressure, causing changes faster than researchers are able to get information about the ecosystems involved. A correct fish identification in different life stages or processing forms (steak or flitch) helps preventing any species substitution, either accidental or intentional. Given the need of correctly identifying fish species, molecular informations can become key pieces to achieve that. One way to identify different vertebrate groups is the use of the COI gene - Cytochrome Oxidase subunit I, as a "bar code system" (Barcode), already used in several countries. In Brazil, initiatives that aim to mitigate misidentifications are still incipient, allowing economic and ecological losses. This study aims to identify the authenticity of fish sold at the Public Market of Florianópolis/SC. Thus, 82 samples of steak and flitch were collected from commercial establishments; genomic DNA was extracted and prepared for sequencing. From the 82 initial samples, 62 were sequenced. 7 fraudulent substitutions with similarity equal to or above 98% were detected, in which species of high commercial value were replaced by low commercial value species, hoodwinking consumer's rights.

Keywords: Cytochrome oxidase subunit I, Barcode, Fish, Fraud, Conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representando a molécula do DNA mitocondrial. A região do gene Citocromo Oxidase subunidade I está em destaque 28

Figura 2 – Imagens das espécies identificadas pelo nome popular46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação gráfica do número de amostras coletadas, levando em consideração o nome popular, algumas espécies são consideradas genericamente como, cação e pescada..... 39

Gráfico 2 – Representação gráfica dos resultados obtidos após comparação com os bancos de dados..... 40

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Identificação comparativa considerando o nome declarado das espécies comercializadas e a espécie identificada por *Barcode* no BOLD e no BLAST. Todas as espécies obtiveram níveis de similaridade maior ou igual a 98%, indicando que a amostra testada pertence à espécie identificada (Identidade \geq 98%), com exceção das espécies cujo Nome popular está marcado com asterisco, onde os valores foram inferiores ao mínimo desejado (Identidade $<$ 98%) e NI – não identificadas, nas quais não houve associação entre a sequência e nenhum dos bancos de dados 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOLD	<i>Barcode of Life Database</i>
COI	Citocromo Oxidase subunidade I
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	mililitros
mM	Milimolar
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
PVC	Policloreto de Vinilo
rpm	Rotações por minuto
s	segundos
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TA	Temperatura Ambiente
TBE	Tris/ Borate/ EDTA
UV	Ultravioleta
V	Volts
X	vezes
μL	Micro litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2.OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVOS GERAIS	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 COLETA	33
3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	33
3.3 EXTRAÇÃO DNA GENÔMICO	34
3.4 AMPLIFICAÇÃO DOS SEGMENTOS DE DNA	34
3.5 CORRIDA ELETROFORÉTICA DOS SEGMENTOS AMPLIFICADOS	35
3.6 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS	35
3.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	36
3.8 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS	37
4. RESULTADOS	39
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

Devido à sua extensa costa, o Brasil é geograficamente favorecido para a prática da pesca marinha, costeira e continental. A atividade pesqueira gera um produto interno bruto de R\$ 5 bilhões de peixes pescados e cultivados (MPA, 2014). Entre os estados brasileiros, Santa Catarina é responsável pela retirada de 150 mil toneladas de pescado marinho todos os anos, além de sediar um dos maiores parques pesqueiros industriais do Brasil (SEAFOOD BRASIL, 2014).

Santa Catarina, com um litoral de 531Km (correspondendo a 7,2% do litoral brasileiro), consolidou-se em 2014 como o maior produtor de pescado de origem marinha, sendo que a pesca industrial responde por 136 mil toneladas e a pesca artesanal por 14 mil toneladas. Cerca de 20% da produção nacional de pescado industrial está sediada nos municípios de Itajaí e Navegantes, considerado o principal polo pesqueiro do país (Governo de Santa Catarina, 2014).

A pesca praticada no litoral catarinense é uma atividade econômica e social importante representando o 5º produto interno bruto do estado (Governo de Santa Catarina – Agricultura e Pesca, 2014) e, segundo Severo (2008), cerca de 40 mil catarinenses estão envolvidos profissionalmente na atividade. O segmento da pesca industrial representa grande relevância e é exclusivamente voltado para fins comerciais, tendo como objetivo a captura de grande quantidade de pescado (MPA, 2014).

Mundialmente a pesca tem sido alvo de desenvolvimento tecnológico, ao nível do melhoramento dos processos de captura dos peixes, confecção de utensílios de pesca mais resistentes e duradouros, utilização de equipamentos eletrônicos e imagens de satélite para a localização do cardumes, propiciando assim o aumento das quantidades capturadas de pescado (AFONSO-DIAS, 2007).

Por outro lado, esse crescimento também gerou consequências negativas. Estima-se que os estoques pesqueiros tiveram uma queda de 90% desde a década de 1950 (UNESPCIÊNCIA, 2014). Praticamente todos os ecossistemas marinhos vêm sofrendo com as alterações provocadas pelas atividades humanas, principalmente com o crescente aumento da pressão de uso dos recursos marinhos (JACKSON et al., 2001), bem como alterações ambientais. As ameaças indiretas provocadas pelo turismo, degradação dos ambientes costeiro, como manguezais, recifes de coral e bancos de vegetação subaquática também geram impactos ainda não mensurados, pois a diversidade da fauna marinha ainda não é completamente conhecida. No Brasil são

anualmente descritas dezenas de espécies de peixes, supondo que a riqueza da ictiofauna brasileira seja muito maior do que 1.298 espécies descritas (ROSA e LIMA, 2008).

Ocorreram mudanças evidentes na percepção da sociedade e dos cientistas sobre a fartura de recursos marinhos disponíveis e sua alta resiliência frente aos distúrbios causados pelo homem (ROBERTS, 2003). Entretanto, as alterações ocorrem em uma alta taxa mesmo antes dos pesquisadores conseguirem informações sobre os ecossistemas (GERHARDINGER et al., 2006). Esse crescente aumento também levou a uma maior ganância e aumento dos lucros e uma das formas é a substituição de pescados de alto valor comercial por espécies de valor muito reduzido, aumentando assim a lucratividade (CARVALHO et al., 2011). Um grande problema enfrentado no comércio pesqueiro é a concorrência desleal gerada pela comercialização de peixes erroneamente vendidos para a produção de filés e produtos processados (CARVALHO et al., 2008).

A correta identificação dos peixes, nos diferentes estágios de vida e de seus produtos, é de extrema importância, pois possibilita a detecção de fraudes em transações comerciais (SMITH et al., 2008), subsídio para o manejo e sustentabilidade da pesca, além de contribuir para a pesquisa de identificação de espécies crípticas (HEBERT et al., 2004).

A principal forma de beneficiamento dos peixes, em todo o mundo é a filetagem (processo de produção de filé e remoção de aparas) devido à aceitação no mercado consumidor, praticidade do preparo de pratos, maior durabilidade devido ao fato de eliminar ou reduzir a ação dos microrganismos, o que possibilita um incremento no preço do quilo quando comparado à mesma espécie vendida inteira (BRITO, 2013). O processamento dos pescados comercializados gera um problema para a identificação das espécies pela retirada das características morfológicas, dificultando a identificação dos produtos, o que possibilita a substituição de espécies de forma acidental ou intencional (GALIMBERTI et al., 2013).

As substituições não intencionais ocorrem por diferentes motivos e em diferentes etapas da cadeia produtiva, devido a morfologia similar entre as espécies ou o mesmo nome popular de diferentes espécies, ou até mesmo quando a mesma espécie é conhecida por diferentes nomes no país ou países distintos (ARDURA et al., 2010; CAWTHORN et al., 2012; BARBUTO et al., 2010). Por outro lado, as substituições intencionais ocorrem na maioria das vezes objetivando o aumento dos lucros, quando espécies de baixo valor ou pouca aceitação no mercado são vendidas como espécies de alto valor comercial (CAWTHORN et

al., 2012; CARVALHO et al., 2011). Outra estratégia de fraude está relacionada a espécies proibidas para a pesca, vulneráveis ou sobrexploradas, que são vendidas na forma de postas ou filés enganando assim a fiscalização e o consumidor final (BARBUTO et al., 2010). As substituições na cadeia produtiva de pescados implicam em perdas econômicas, ecológicas, muitas vezes afetando o estado de conservação das espécies (ARDURA et al., 2013; GALIMBERTI et al., 2013).

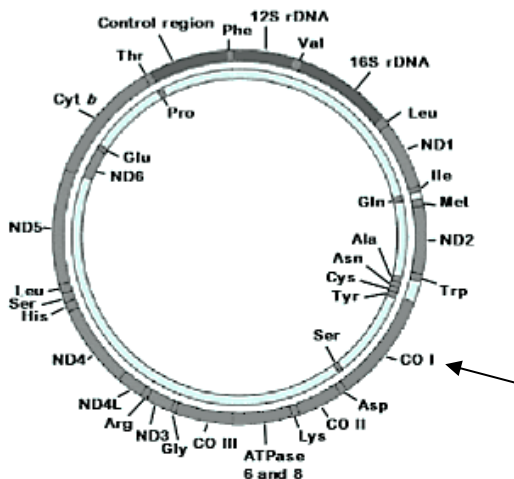
O declínio de algumas populações de peixes, a falta de medidas de conservação ou manejo, o aumento crescente das fraudes e a inegável importância ecológica que os peixes exibem, levou a publicação da Portaria nº 445 de 17 de dezembro de 2014 que ampliou a lista de espécies de peixes e invertebrados aquáticos da fauna brasileira como ameaçados de extinção, isto é, aquelas constantes da “Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Peixes e Invertebrados Aquáticos”. As espécies constantes na lista ficam protegidas de modo integral sendo proibida a captura, transporte, armazenamento, guarda, manejo, beneficiamento e comercialização (MMA, 2014). Entre estas espécies estão peixes como garoupa, namorado, alguns cações, raias, os quais muitas vezes são comercializados de forma fraudulenta ou capturados incidentalmente e não descartados no ato da captura. Diante deste cenário surgiu a necessidade de avaliar a autenticidade da identificação dos produtos processados de pescados.

Marcadores moleculares podem contribuir para a identificação de espécies, estimativa do tamanho efetivo de populações, identificação de populações-chave para a conservação de recursos genéticos e para determinação genética do impacto da introdução de populações e peixes cultivados em determinada área (CARVALHO et al., 2008; ARDURA et al., 2013; HANNER et al., 2011).

Segundo Ferguson (1995) as informações moleculares podem ser peças-chave para a definição de estratégias de melhoramento e construção de mapas genéticos. Uma das alternativas foi proposta como código de barras (*barcode*) para identificação de diversos grupos de vertebrados, uma região de 650 pares de base da porção 5' da Citocromo Oxidase Subunidade I – COI com alta sensibilidade e confiabilidade na diferenciação das espécies animais, inclusive daquelas que divergiram recentemente (HEBERT et al., 2003).

O genoma mitocondrial é um DNA circular fechado (Figura 2), no qual não há presença de íntrons e alguns genes se sobrepõem (ALBERTS, 2010).

Figura 1: Esquema representando a molécula do DNA mitocondrial. A região do gene Citocromo Oxidase subunidade I está em destaque.



Fonte: Pereira, 2000

A utilização do COI como *Barcode* animal apresenta vantagens como regiões de sequência conservada, as quais permitem o desenvolvimento de iniciadores universais – *primers* (PALUMBI, 1996), herança uniparental materna, ausência de recombinação e altas taxas evolutivas (CALCAGNOTTO et al., 2005).

Em muitos países, na tentativa de coibir substituições no setor pesqueiro, são adotadas medidas de identificação, as quais incluem sequências do Citocromo Oxidase Subunidade I, nomes comuns, científicos e comerciais das espécies comercializadas, além de outras informações que garantam a procedência e qualidade dos produtos (FDA – EUA; EC 104/ 2000; EC 2065/ 2001). No Brasil a Instrução Normativa nº 22 de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2005) exige apenas que nos rótulos dos produtos conste o nome específico do produto de origem animal, o que não impede substituições e rotulagens indevidas, especialmente em produtos processados.

No mercado de frutos do mar, a remoção de características morfológicas, torna-se um problema para a identificação das espécies de peixes comercializados na forma de filés e postas. Assim o objetivo do presente estudo é utilizar uma ferramenta molecular de identificação biológica, DNA *Barcode* para a identificação da autenticidade de

produtos pesqueiros comercializados, propiciando o benefício da certeza de consumir pescados devidamente identificados. Neste contexto, e considerando a necessidade de beneficiar a comunidade através da pesquisa acadêmica, a aplicação da técnica de *Barcode* na identificação de fraudes propicia o benefício (financeiro e de saúde) da certeza de consumir pescados, pagando o preço justo por estes, bem como a proteção de espécies ameaçadas de extinção, denunciando quando estas são indevidamente comercializadas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a autenticidade da identificação dos pescados comercializados no Mercado Público Municipal de Florianópolis/SC, através do DNA *Barcode*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⌘ Identificar as espécies de peixes de interesse econômico comercializadas em Santa Catarina;
- ⌘ Sequenciar os segmentos do gene mitocondrial COI e identificar as amostras de peixes coletadas em peixarias do Mercado Público Municipal de Florianópolis/SC;
- ⌘ Diferenciar as espécies presentes nos pontos de coleta com base em um sistema de “código de barras” *Barcode*, comparando-os com os bancos de dados *BOLD Systems* e *GenBank*;
- ⌘ Em caso de substituições, identificar que espécies foram utilizadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho está relacionado a um projeto maior intitulado “Gato por Lebre: Identificação Molecular (*Barcode*) de pescados comercializados em Santa Catarina”, que vem sendo realizado e executado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em vigência desde 2014 até os dias atuais.

Todas as amostras de peixes foram coletadas em peixarias utilizadas no presente trabalho estão armazenadas no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (BEG-CCB-UFSC), para identificação e realização de estudos futuros. O projeto conta ainda com a colaboração do Laboratório de Biologia de Teleósteos e Elasmobrânquios (LABITEL), do Departamento de Ecologia e Zoologia da UFSC (ECZ-CCB-UFSC).

3.1 COLETA

As coletas de amostras de peixes em filés e/ou postas foram feitas em duas grandes campanhas realizadas nos meses de julho e outubro de 2014, totalizando 82 amostras. Na primeira campanha as amostras foram coletas em quatro diferentes peixarias, e na segunda campanha, foram coletadas em oito diferentes peixarias todas localizadas no Mercado Público Municipal de Florianópolis – SC.

As amostras foram coletadas em diferentes peixarias, nas quais os proprietários e funcionários dos estabelecimentos permitiram a coleta, após a apresentação e esclarecimento a respeito do projeto, sendo que foi acordada a não divulgação dos nomes dos estabelecimentos após a obtenção dos resultados. Destes estabelecimentos foram coletados pequenos fragmentos de filés e/ou postas de peixes, sendo os mesmos armazenados em tubos tipo *Eppendorf*® 1,5mL contendo álcool 96% (*Merck*®).

3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras coletadas a partir do tecido muscular dos peixes, foram fracionadas em pedaços menores de 1cm³ (semelhantes ao tamanho de um grão de arroz), possibilitando assim várias extrações referentes a uma mesma amostra. Os tubos são armazenados em temperatura ambiente.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico seguiu o protocolo da técnica de *Salting Out*, descrita por John et al. (1991) e modificada por Lahiri & Nurnberger (1991). Foram feitas pequenas adaptações no volume de cada reagente e soluções para as extrações de tecido muscular de peixes. De cada amostra armazenada em álcool foi retirado um pequeno fragmento que foi seco em papel toalha para evitar a interferência do álcool nas reações. Posteriormente, foram acrescentados 600µL de Solução de Lise II (Tris-HCl 0,01M, *Amresco*®; KCl 0,05M, *Vetec*®); MgCl₂ 0,0025M, (*Nuclear*®); Nonidet – 1%, (*Amresco*®); TWEEN 20 – 1%, (*Amresco*®), 20µL de SDS 10% (*Amresco*®) e 150µL de Perclorato de Sódio 5M (*Vetec*®). As amostras foram maceradas com o auxílio de um pistilo de PVC, tesoura e/ou pinça, obtendo uma mistura homogênea de minúsculos fragmentos do tecido junto com as soluções. Posteriormente foram agitadas em um agitador de tubos (*Vortex*®); em cada tubo foi acrescentado 260µL de NaCl 6M (*Nuclear*®) e a seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Novos microtubos de 1,5mL foram identificados e, para estes, foram transferidos os sobrenadantes resultantes da centrifugação. Ao sobrenadante foram adicionados 600µL de Álcool Isopropílico Absoluto (*Merck*®) e as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi acrescentado 600µL de Etanol 70% (*Merck*®). As amostras foram centrifugadas a 12.000rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mantido a temperatura ambiente por 12h para secagem. Após a secagem dos precipitados, foi adicionado a cada tubo 100µL de água ultrapura *Mili-Q*® para eluir o DNA e, posteriormente, armazenadas a -20°C.

Algumas amostras foram quantificadas por espectrofotometria no aparelho *Nano Drop Thermo Scientific*® e em seguida foram feitas alíquotas para solução estoque e solução de uso.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DOS SEGMENTOS DE DNA

A genotipagem das amostras foi realizada pela amplificação de sequências-alvo específicas do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I - COI pela técnica PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam as regiões gênicas de interesse. Os primers utilizados L5698 – Asn F 5'AGG CCT CGA TCC TAC AAA GKT TTA GTT AAC 3' (MIYA & NISHIDA, 2000) e H7271 – COI R 5' GTG GTG GGC TCA TAC AAT AAA 3' (MELO et al., 2011).

Para a reação de amplificação foram adicionadas as concentrações mencionadas abaixo em tubos de 0,2mL (tipo *Eppendorf*®) e adicionados 1μL de DNA genômico da amostra desejada totalizando o volume final de 25μL. As amostras foram colocadas em um termociclador (*Thermal Cycler, Veriti 96 Well, Applied Biosystems*®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e, em seguida, a 35 ciclos de: 94°C por 30s, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos; e um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos (CHIACHIO, 2009), utilizando os seguintes reagentes:

1. Água ultrapura *Mili-Q*®;
2. dNTPs 0,2mM de cada (100mM, *Invitrogen*®);
3. MgCl₂ 1,5mM (50mM, *Invitrogen*®);
4. Tampão de PCR 1X (10X, 0,2M Tris-HCl pH 8,5; 0,5M KCl; *Invitrogen*®);
5. Primer Forward (10pmol HLAGR, *IDT*®);
6. Primer Reverse (10pmol HLAGF, *IDT*®);
7. Taq DNA Polymerase Platinum 0,5U/μL (5U/ μL; *Invitrogen*®) e Taq DNA Polymerase 0,5U/μL (5U/ μL; *Invitrogen*®)

3.5 CORRIDA ELETROFORÉTICA DOS SEGMENTOS AMPLIFICADOS

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose em concentração de 1% (95V, 50 minutos). Para o preparo dos géis foram adicionados 40mL de TBE 0,5X (50mL de TBE 10X; 950mL de água); 0,4g de agarose. Para a corrida eletroforética se utilizou tampão TBE 0,5X em presença do corante fluorescente *GelRed*™. Após a eletroforese o gel foi submetido à luz UV para visualização da região gênica amplificada, tendo posteriormente suas imagens capturadas pelo fotodocumentador *DNR-Bio-Imaging Systems MiniBIS PRO*® através do software *GelCapture*®, que foram então analisadas.

Em toda PCR foi utilizado um controle negativo (CN) com água ultrapura ao invés de DNA genômico para assegurar a ausência de contaminação por DNA exógeno durante a reação.

3.6 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS

Após análise da amplificação, o produto de PCR foi purificado com o auxílio da enzima *ExoSAP-IT*® (Exonuclease I: Recombinant; SAP: *Pandalus borealis* – USB Corporation). Em microtubos de 0,2μL adicionou-se 0,5μL de Exo; 0,5μL de SAP; 9μL de produto da PCR

inicial amplificado. As amostras foram colocadas no termociclador (*Thermal Cycler, Veriti 96 Well, Applied Biosystems®*) e submetidas ao seguinte programa: 37°C por 60 minutos; 75°C por 15 minutos. O produto de purificação foi analisado em gel de agarose em concentração de 1% (95V, 30 minutos), utilizando 2µL do produto purificado; em presença do corante fluorescente *GelRed™*. Para a corrida eletroforética foi utilizado tampão TBE 0,5X, sendo que as mesmas concentrações foram utilizadas para o preparo do gel. Após a eletroforese o gel foi submetido à luz UV para visualização da região amplificada e purificada, tendo posteriormente suas imagens capturadas pelo fotodocumentador *DNR-Bio-Imaging Systems MiniBIS PRO®* através do software *GelCapture©*, que foram então analisadas

3.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Para a reação de PCR foi utilizado 1,0µL de *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems®)*; 1,5µL de tampão *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems®)*; 1,0µL do *Primer H7271-COI R* e eventualmente o *Primer L5698-Asn F* 5pmol/µL; 6,5µL de produto da PCR inicial purificado aplicado em microplaca para PCR de 96 wells *Axygen®*, selado com filme de vedação para microplacas *Axygen®* e levada ao termociclador (*Thermal Cycler, Veriti 96 Well, Applied Biosystems®*) sob o seguinte programa: 96°C por 2 minutos; 35 ciclos a 96°C por 30s, 50°C por 15s, 60°C por 4 minutos e etapa final a 12°C.

Para precipitação do DNA foi adicionado 2,5µL de EDTA 125mM *Vetec®*; 25µL de etanol absoluto *Merck®* nas amostras. Após a reação de PCR para sequenciamento, a microplaca foi selada e homogeneizada por inversão 4X. Levada para a centrifuga de microplacas modelo 5804 R *Eppendorf®* centrifugada por 45 minutos a 4.000rpm. A seguir o sobrenadante foi descartado, adicionado 150µL de etanol 70% *Merck®*, novamente centrifugada por 15 minutos a 4.000rpm, descartado o sobrenadante e centrifugada a placa invertida sobre papel toalha, *spin* a 300rpm. Após estes procedimentos a microplaca foi mantida em temperatura ambiente para secar (*overnight*) e/ou em estufa, em local escuro, em seguida foi encaminhado para o sequenciamento.

As seqüências das amostras amplificadas foram obtidas através da técnica de sequenciamento por capilaridade no sequenciador Modelo ABI 3130 *Applied Biosystems®* no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu/ SP e através da técnica de sequenciamento por capilaridade no sequenciador Modelo 3500 *Series*

Genetic Analyzer da *Applied Biosystems*® no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC, campus Trindade, Florianópolis/ SC.

3.8 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

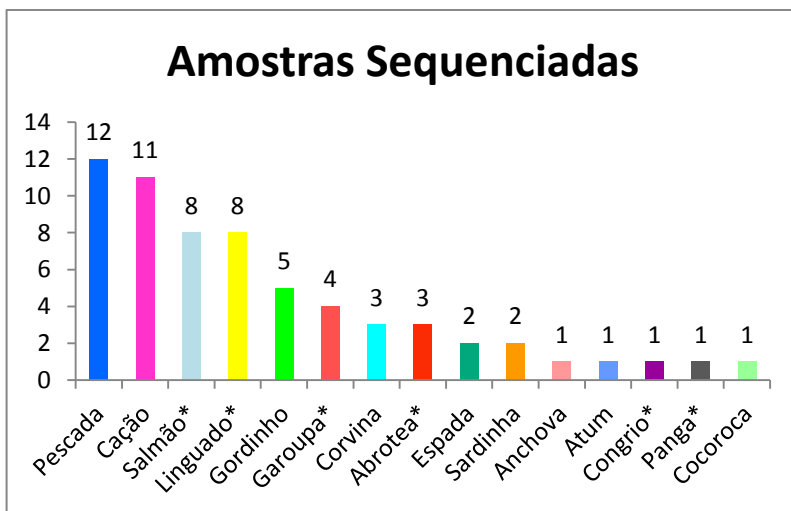
Os cromatogramas resultantes do sequenciamento foram analisados manualmente e as sequências de DNA revisadas no *software Chromas Lite 2.1.1 Technelysium*®. Verificada a qualidade dos picos de sequenciamento, os arquivos em formato FASTA das sequências obtidas foram comparados nos bancos gênicos *on-line BOLD Systems* (www.boldsystems.org) e *Blast*® *GenBank* (blast.ncbi.nlm.nih.gov) (ALTSCHUL et al., 1997). No *Blast*® foi utilizado o programa *Nucleotide Blast* que pesquisa um banco de dados de nucleotídeos usando uma consulta de nucleotídeos. No BOLD foi utilizado o método de pesquisa “*Species Level Barcode Records*” que considera as sequências com mais de 98% de similaridade com a pesquisada e comprimento mínimo da sequência de 500pb.

Os dados gerados foram organizados em uma tabela comparativa, considerando as informações obtidas nas coletas e no sequenciamento. Foram consideradas válidas aquelas com índice de similaridade igual ou superior a 98% em um ou ambos os bancos.

4. RESULTADOS

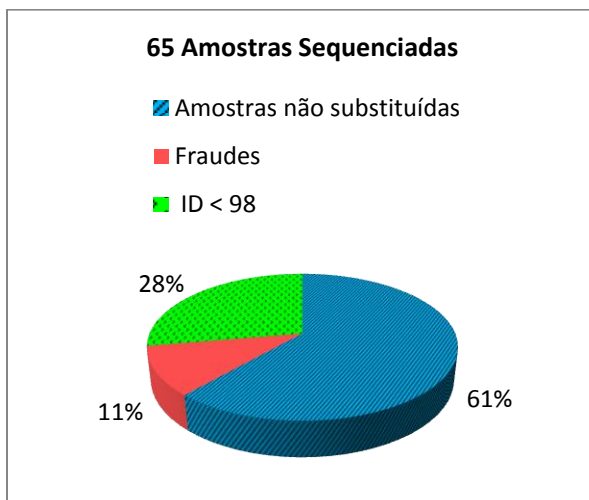
Das 82 amostras coletadas, 65 amostras foram enviadas para sequenciamento e estão classificadas em 21 espécies diferentes, cujos números de indivíduos estão representados também no Gráfico 1. Destas 65 amostras sequenciadas, 18 não foram eficientemente identificadas quando comparadas aos bancos de dados e sete apresentaram substituições fraudulentas (Gráfico 2). Os resultados obtidos das análises de sequências comparadas nos bancos de dados BOLD e GenBank são apresentados na Tabela 1.

Gráfico 1: Representação gráfica do número de amostras coletadas, levando em consideração o nome popular. Algumas espécies são consideradas genericamente (e.g. cação, pescada).



Fonte: Elaborado pela autora, 2015.

Gráfico 2: Representação gráfica dos resultados obtidos após comparação com os bancos de dados.



Fonte: Elaborado pela autora, 2015.

Tabela 1: Identificação comparativa considerando o nome declarado das espécies comercializadas e a espécie identificada por *Barcode* no BOLD e no BLAST. Todas as espécies obtiveram níveis de similaridade maior ou igual a 98%, indicando que a amostra testada pertence à espécie identificada (Identidade $\geq 98\%$), com exceção das espécies cujo Nome popular está marcado com asterisco (*), onde os valores foram inferiores ao mínimo desejado (Identidade $< 98\%$) e NI – não identificadas, nas quais não houve associação entre a sequência e nenhum dos bancos de dados. Em negrito estão destacadas as fraudes identificadas.

ID	Nome atribuído ¹	Espécie atribuída ¹	Espécie BOLD ²	Espécie BLAST ²	Nome popular ³
PXR001	Abrotea	<i>Urophycis</i> sp.	No match	No match	NI
PXR002	Abrotea	<i>Urophycis</i> sp.	<i>Micropogonias furnieri</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	Corvina
PXR003	Abrotea	<i>Urophycis</i> sp.	No match	No match	NI
PXR004	Anchova	<i>Pomatomus saltatrix</i>	<i>Pomatomus saltatrix</i>	<i>Pomatomus saltatrix</i>	Anchova
PXR005	Atum	<i>Thunnus</i> sp.	<i>Thunnus alalunga</i>	<i>Thunnus orientalis</i>	Atum
PXR006	Cação	-	<i>Sphyrna lewini</i>	<i>Sphyrna lewini</i>	Tubarão Martelo
PXR007	Cação	-	<i>Carcharhinus plumbeus</i>	<i>Carcharhinus altimus</i>	Bignose Shark
PXR008	Cação	-	<i>Prionacea glauca</i>	<i>Prionace glauca</i>	Tubarão azul
PXR009	Cação	-	<i>Prionacea glauca</i>	<i>Prionacea glauca</i>	Tubarão azul
PXR010	Cação	-	<i>Prionacea glauca</i>	<i>Prionacea glauca</i>	Tubarão azul
PXR011	Cação	-	No match	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada*
PXR012	Cação Azul	<i>Prionacea glauca</i>	No match	<i>Prionace glauca</i>	Tubarão azul
PXR013	Cação Azul	<i>Prionacea glauca</i>	<i>Prionacea glauca</i>	<i>Prionace glauca</i>	Tubarão azul
PXR014	Cação Mangona	<i>Carcharias taurus</i>	<i>Prionacea glauca</i>	<i>Prionace glauca</i>	Tubarão azul
PXR015	Cação Mangona	<i>Carcharias taurus</i>	<i>Prionacea glauca</i>	<i>Prionace glauca</i>	Tubarão azul

PXR016	Cação Mangona	<i>Carcharias taurus</i>	No match	<i>Prionace glauca</i>	Tubarão azul*
PXR017	Cação Mangona	<i>Carcharias taurus</i>	<i>Prionace glauca</i>	<i>Prionace glauca</i>	Tubarão azul
PXR018	Cação Mangona	<i>Carcharias taurus</i>	<i>Prionace glauca</i>	<i>Prionace glauca</i>	Tubarão azul
PXR019	Cocoroca	<i>Orthopristis ruber</i>	<i>Orthopristis ruber</i>	<i>Orthopristis ruber</i>	Cocoroca
PXR020	Congrio	<i>Conger orbignianus</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	Corvina
PXR021	Corvina	<i>Micropogonias furnieri</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	Corvina
PXR022	Corvina	<i>Micropogonias furnieri</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	Corvina
PXR023	Corvina	<i>Micropogonias furnieri</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	Corvina
PXR024	Espada	<i>Trichiurus lepturus</i>	<i>Trichiurus lepturus</i>	<i>Trichiurus lepturus</i>	Peixe Espada
PXR025	Espada	<i>Trichiurus lepturus</i>	<i>Trichiurus lepturus</i>	<i>Trichiurus lepturus</i>	Peixe Espada
PXR026	Garoupa	-	No match	<i>Prionace glauca</i>	Tubarão azul*
PXR027	Garoupa	-	No match	No match	NI
PXR028	Garoupa	-	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR029	Garoupa	-	No match	<i>Micropogonias furnieri</i>	Corvina
PXR030	Gordinho	<i>Peprilus paru</i>	No match	No match	NI
PXR031	Gordinho	<i>Peprilus paru</i>	<i>Peprilus paru</i>	<i>Peprilus paru</i>	Gordinho
PXR032	Gordinho	<i>Peprilus paru</i>	<i>Peprilus paru</i>	<i>Peprilus paru</i>	Gordinho
PXR033	Gordinho	<i>Peprilus paru</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	Corvina
PXR034	Gordinho	<i>Peprilus paru</i>	<i>Peprilus paru</i>	<i>Peprilus paru</i>	Gordinho
PXR035	Linguado	<i>Paralichthys</i> sp.	<i>Paralichthys orbignyanus</i>	<i>Paralichthys orbignyanus</i>	Linguado

PXR036	Linguado	<i>Paralichthys</i> sp.	<i>Paralichthys orbignyanus</i>	<i>Paralichthys orbignyanus</i>	Linguado
PXR037	Linguado	<i>Paralichthys</i> sp.	No match	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada*
PXR038	Linguado	<i>Paralichthys</i> sp.	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR039	Linguado	<i>Paralichthys</i> sp.	<i>Isopisthus parvipinnis</i>	<i>Isopisthus parvipinnis</i>	Pescada
PXR040	Linguado	<i>Paralichthys</i> sp.	<i>Paralichthys patagonicus</i>	<i>Paralichthys patagonicus</i>	Linguado
PXR041	Linguado	<i>Paralichthys</i> sp.	<i>Micropogonias furnieri</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	Corvina
PXR042	Linguado	<i>Paralichthys</i> sp.	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR043	Maria Luisa	<i>Paralichthys brasiliensis</i>	<i>Isopisthus parvipinnis</i>	<i>Isopisthus parvipinnis</i>	Pescada
PXR044	Panga	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	Corvina
PXR045	Pescada	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR046	Pescada	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR047	Pescada	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR048	Pescada	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR049	Pescada	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR050	Pescada Branca	<i>Isopisthus parvipinnis</i>	<i>Isopisthus parvipinnis</i>	<i>Isopisthus parvipinnis</i>	Pescada
PXR051	Pescada M ^a Mole	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR052	Pescada M ^a Mole	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR053	Pescada M ^a Mole	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR054	Pescadinha	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR055	Pescadinha	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada

PXR056	Salmão	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo salar</i>	Salmão
PXR057	Salmão	<i>Salmo salar</i>	No match	<i>Salmo salar</i>	Salmão*
PXR058	Salmão	<i>Salmo salar</i>	<i>Prionacea glauca</i>	<i>Prionacea glauca</i>	Tubarão azul
PXR059	Salmão	<i>Salmo salar</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR060	Salmão	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo salar</i>	Salmão
PXR061	Salmão	<i>Salmo salar</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescada
PXR062	Salmão	<i>Salmo salar</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	Corvina
PXR063	Salmão	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo salar</i>	Salmão
PXR064	Sardinha	<i>Sardinella</i> sp.	<i>Sardinella</i> sp.	<i>Sardinella</i> sp.	Sardinha
PXR065	Sardinha	<i>Sardinella</i> sp.	<i>Sardinella</i> sp.	<i>Sardinella</i> sp.	Sardinha

Fonte: Elaborado pela autora, 2015.

1. Nome popular e científico, respectivamente da amostra conforme obtido no momento da coleta; A ausência de nome científico indica que pode tratar-se de uma variedade de espécies.
2. Nome científico da espécie cujas sequências depositadas nos bancos de dados retornaram a maior similaridade com a sequência obtida na análise.
3. Nome popular atribuído à espécie identificada na análise, de acordo com o banco de dados FISHBASE (www.fishbase.org) e identificação taxonômica de especialista.

Das quatro amostras de filés de *Urophycis* sp. identificadas no ato da coleta como abrótea, enviadas para o sequenciamento, três não apresentaram resultados quando comparadas aos bancos de dados e a única satisfatoriamente sequenciada indicou a substituição por *Micropogonias furnieri*, cujo nome popular é corvina.

Doze amostras identificadas genericamente como pescada (*Cynoscion guatucupa*), pescada-branca (*Isopisthus parvipinnis*) e Maria-luisa (*Paralichthys brasiliensis*), 12 amostras foram sequenciadas e apenas a espécie *P. brasiliensis* foi substituída por *I. parvipinnis*, as demais não apresentaram substituições.

De *Paralichthys orbignyanus* – linguado, foram obtidas quatorze amostras, das quais dez destas foram sequenciadas, duas apresentaram substituições por *C. guatucupa*.

Das doze amostras de cação, identificadas no ato da coleta como, cação, cação azul e cação mangona 11 foram sequenciadas, 10 apresentaram similaridade $\geq 98\%$.

As amostra de *Peprilus paru* – gordinho, não apresentaram substituições, sendo que 3 apresentaram similaridade superior a 98% e uma apresentou resultados abaixo do valor mínimo considerado aceitável.

A espécie *Salmo salar* – salmão, teve doze amostras sequenciadas, das quais 3 apresentaram similaridade superior a 98%, apenas 1 apresentou substituição por *M. furnieri*.

Epinephelus marginatus – garoupa, teve quatro amostras coletadas e sequenciadas e uma apresentou similaridade com os bancos de dados e foi constatada substituição por *C. guatucupa* – pescada.

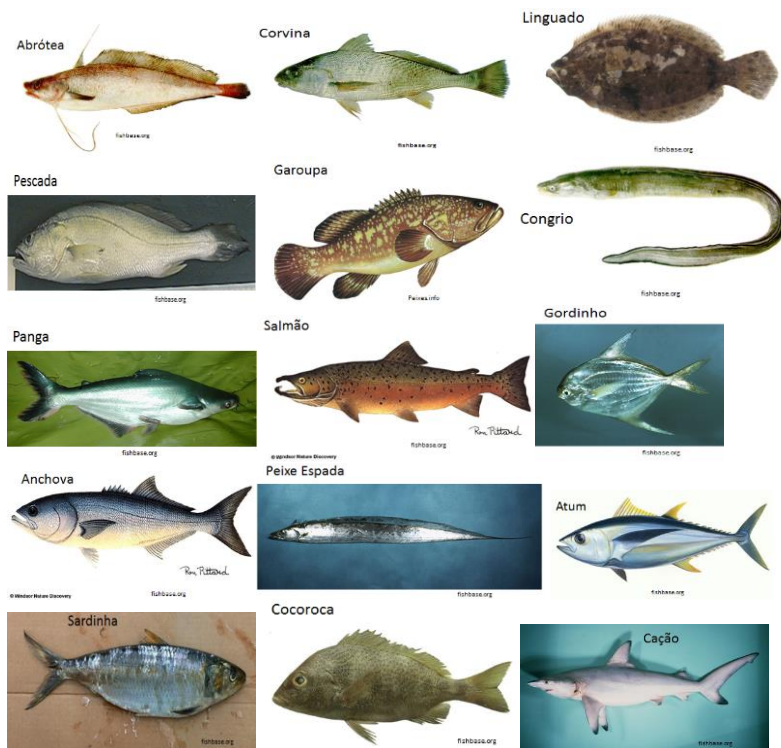
Das seguintes espécies: *Sardinella brasiliensis* - sardinha, *Seriola lalandi* – olhete, *Pomatomus saltatrix* – anchova, *Orthopristis ruber* - cocoroca, *Thunnus* sp. - atum foi obtida apenas uma amostra e apresentaram similaridade superior a 98% em comparação com as referidas espécies pelos bancos de dados.

Outras espécies que tinham somente uma amostra eram *Pangasius hypophthalmus* – panga e *Conger orbignianus* – congrio e estas foram substituídas por *M. furnieri*.

Entre as três amostras de *M. furnieri*, e as duas amostras de *Trichiurus lepturus* – peixe espada, não foram identificadas substituições.

As imagens das espécies identificadas pelo nome popular, no presente trabalho, estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2: Imagens das espécies identificadas pelo nome popular.



Fonte: FishBase e peixes.info.

5. DISCUSSÃO

Uma elevada taxa de substituições de espécies de peixes são registradas no Brasil e no mundo (WONG & HANNER, 2008; FILONZI et al., 2010; WARNER et al., 2012; BÉNARD-CAPELLE et al., 2015; CARVALHO et al., 2011; CARVALHO et al., 2014), este fato ocorre principalmente pela retirada de caracteres morfológicos que inviabilizam a correta identificação dos mesmos. Nos últimos anos a ferramenta molecular DNA *Barcoding* vem sendo utilizada como uma metodologia confiável para este fim. Segundo Ratnasingham & Hebert, (2007), a taxa de divergência que indivíduos da mesma espécie apresentam considerando o gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) é no máximo 2%.

Diante desta afirmação, verifica-se ao comparar com os resultados obtidos no presente estudo que das 65 sequências de COI obtidas 11%, revelaram substituições fraudulentas, sendo que espécies de alto valor comercial foram substituídas por espécies de valor muito reduzido. Outra faceta da fraude é que o consumidor final que, às vezes, não é capacitado a distinguir o produto manufaturado (peixe filetado) pode ser ludibriado.

Cerca de 50% de toda a frota pesqueira catarinense é dedicada à captura de recursos demersais (ANDRADE et al., 2004). Por exemplo, a abrótea - *Urophycis* sp. é um recurso demersal tradicionalmente explorado, destacando-se pelo volume desembarcado e pelo preço de mercado o que indica que o recurso pode estar sendo sobreexplorado, isto é, o esforço de pesca é maior do que é recomendável. No presente trabalho verificou-se que esta espécie foi substituída pela corvina, indicando fraude. Cabe ressaltar que a corvina (*M. furnieri*) foi a espécie mais utilizada nas substituições detectadas no presente trabalho. Por ser um peixe muito comum na zona costeira do sul do Brasil e ter significativa importância comercial devido sua participação na produção pesqueira característica (ALVES & LUQUE, 2001) uma possível explicação é que este cenário leve a uma maior propensão de ser a espécie atribuída às substituições fraudulentas.

Santa Catarina é o estado brasileiro que mais captura o peixe *P. orbignyanus* – linguado, sendo um dos principais alvos das frotas pesqueiras que apresenta uma grande procura no mercado de pescados (SAMPAIO & BIANCHINI, 2002). Assim as substituições fraudulentas detectadas no presente estudo no qual o linguado foi substituído por pescada, podem ser atribuídas a maior lucratividade, pois o mesmo é

vendido na forma de filés, o que dificulta a identificação por parte dos consumidores.

A pesca de *C. guatucupa*, conhecida popularmente como pescada, é um dos recursos pesqueiros de maior importância no comércio de peixes (DE BRITO et al., 2015). Os estoques populacionais ainda são pouco conhecidos (TIMI et al., 2005), juntamente com *M. furnieri* – corvina (ALVES & LUQUE, 2001). Das amostras de pescada geneticamente identificadas foi detectada a substituição da espécie popularmente conhecida como Maria-Luisa por pescada branca, sendo que as duas são conhecidas popularmente como pescadas.

Os tubarões estão incluídos em um conjunto popularmente conhecido como cação, os quais incluem vários grupos, totalizando 89 espécies registradas no Brasil (ROSA & GADIG, 2014). Historicamente o consumo de tubarões se restringia principalmente aos vilarejos de pescadores, porém este tipo de carne passou a ser difundida com a diminuição dos estoques pesqueiros de outros grupos de peixes (FREITAS, 2013). Os tubarões são suscetíveis à sobrepesca, principalmente pelo alto valor comercial que suas nadadeiras atingem no mercado internacional (ROSA & LIMA, 2008). A dificuldade na identificação dos tubarões é associada à prática da remoção da cabeça e nadadeiras dos animais antes do desembarque, impossibilitando assim, a obtenção de informações morfológicas sobre as espécies capturadas (MENDONÇA et al., 2008). Algumas das amostras do presente estudo foram identificadas no ato da coleta pelos vendedores do mercado público como cação mangona – *Carcharias taurus*, uma das espécies reconhecidas como ameaçadas de extinção (categoria de criticamente em perigo) que apresenta proteção integral e com captura proibida pela portaria nº 445 de 17 de dezembro de 2014 do Ministério do Meio Ambiente – MMA, a qual foi alterada através da Portaria MMA nº 163, de 8 de junho de 2015. No entanto, não foi identificada a presença desta espécie através da identificação molecular realizada no presente trabalho e entre as identificadas não havia nenhuma na lista de espécies ameaçadas de extinção. Os vendedores provavelmente atribuem essa espécie sem saber se é realmente *C. taurus* em virtude do histórico registro de muitas capturas pela pesca submarina que existia em Florianópolis (SOUZA, 2000).

Conhecida por ser muito apreciada na culinária devido à sua carne branca, a garoupa está ameaçada de extinção, segundo a IUCN, devido a destruição de seus habitats, recifes e estuários, bem como pela sobrepesca (ROSA & LIMA, 2008), ela é uma das espécies que estão protegidas pela portaria nº 445 do MMA. Provavelmente, devido aos

baixos estoques pesqueiros e grande apreciação ela é substituída por espécies que apresentam maior abundância e carne branca quando filetada. Isso foi constatado no presente trabalho no qual a garoupa foi substituída por pescada (*C. guatucupa*).

Outra espécie muito apreciada e valorizada no mercado gastronômico pela sua carne branca e poucos espinhos, o *Conger orbignianus* – congrio, o qual foi substituído por corvina. O congrio é originário da região sul do Brasil e geralmente é capturado por frotas costeiras comerciais (FIGUEROA et al., 2010) sendo um recurso pesqueiro importante, porém sensível a exploração e por ser um predador, é necessário estudos sobre gestão e conservação da espécie (VALE, 2008), dentre as quais a identificação molecular pode contribuir a favor da conservação desta.

O salmão consumido no Brasil, em sua maioria tem origem em viveiros produtores do Chile, Canadá, Estados Unidos e Europa (BEHS, 2011), o que permite a ocorrência de substituições quando outras espécies são também criadas em cativeiro recebendo o mesmo tipo de ração, ou pela adição de corantes durante o processamento dos filés, tornando-o semelhante ao filé de salmão selvagem, confundindo assim o consumidor final (BJERKENG, 2000; BEHS, 2011). Este tipo de adulteração ocorreu nas amostras coletadas, na qual um exemplar de salmão foi substituído por corvina, a qual provavelmente foi manipulada para adquirir a cor característica dos salmões.

O panga, espécie importada do Continente Asiático e que está ameaçada foi discutida por Filonzi et al. (2010) que constataram o uso fraudulento do peixe panga substituindo peixes de alto valor comercial, com o uso de rotulagens inadequadas dos produtos comercializados na Itália. Cabe ressaltar que a amostra coletada no presente estudo e identificada geneticamente por *Barcode* o suposto panga é, na verdade, uma corvina contrariando as substituições observadas no caso italiano. Neto (2013) constatou a substituição do peixe panga por tilápia, um peixe que possui uma carne mais apreciada e frequentemente incorporada aos hábitos alimentares dos brasileiros, diferente do peixe panga que além de menos saborosa, possui um maior teor de gordura. Uma das interpretações sugeridas é que ao substituir o panga por outras espécies, o consumidor está sendo induzindo a acreditar que é uma carne saborosa, podendo contribuir fraudulentamente para maior comercialização do panga no mercado brasileiro.

Muitas das espécies coletadas (anchova, espada, olhete, gordinho e sardinha) que não apresentaram substituições neste trabalho, possuem

poucos dados sobre seu estado de conservação devido ao baixo número de informações e pesquisas.

No cenário pesqueiro atual, a exploração dos pescados ultrapassa em velocidade e número, as pesquisas realizadas, a identificação biológica através do COI é uma ferramenta que contribui com novas possibilidades tecnológicas amplamente acessíveis, proporcionando auxílio para a legalidade do pescado comercializado, além de permitir um novo estímulo nas pesquisas sobre biodiversidade.

A adoção de estratégias e medidas para o controle das substituições fraudulentas irá contribuir para a diminuição dos crimes ambientais, para o comércio ilegal pesqueiro, garantindo transparência ao consumidor final e aos trabalhadores do setor pesqueiro, tornando o produto mais confiável, seguro e com maior valor agregado.

6. CONCLUSÃO

A investigação da ocorrência de fraude e/ou substituições de pescados comercializados permite maior segurança ao consumidor e aumenta a competitividade de pescadores e comerciantes que atuam dentro das normas. Esta investigação é também importante para identificar crimes ambientais, como o consumo indevido de espécies em risco de extinção ou em período reprodutivo (defeso). O aumento do consumo também está ligado às espécies importadas que chegam ao Brasil empacotadas e congeladas, impossibilitando a identificação da espécie consumida, além do informado nas etiquetas

O presente estudo corroborou que a identificação molecular das espécies de pescados processados torna-se uma ferramenta muito importante, auxiliando na sustentabilidade e na pesquisa para ações futuras que visem à conservação das espécies bem como para garantir o direito do consumidor, inibindo assim a corrupção e a adulteração.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., & LIPMAN, D. J. (1997). **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Research*, 25 (17), 389-402.
- AFONSO-DIAS, M. (2007). **Breves notas sobre a história da pesca.** FCMA- Universidade Do Algarve, 1–4.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula.** 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALVES, D. R., & LUQUE, J. L. (2001). **Community ecology of the metazoan parasites of Atlantic moonfish, *Selene setapinnis* (Osteichthyes: Carangidae) from the coastal zone of the State of Rio de Janeiro, Brazil.** *Brazilian Journal of Biology*, 64(3A), 399–406.
- ANDRADE, H. A., DUARTE-PEREIRA, M., & ABREU-SILVA, J. L. (2004). **Idade e crescimento da Abrótea (*Urophycis brasiliensis*) capturada no Sul do Brasil.** *Notas Técnicas da FACIMAR*, 8, 107–117.
- ARDURA, A., PLANES, S., & GARCIA-VAZQUEZ, E. (2013). **Applications of DNA barcoding to fish landings: Authentication and diversity assessment.** *ZooKeys*, 365(SPEC.ISSUE), 49–65.
- ARDURA, A., POLA, I. G., GINUINO, I., GOMES, V., & GARCIA-VAZQUEZ, E. (2010). **Application of barcoding to Amazonian commercial fish labelling.** *Food Research International*, 43(5), 1549–1552.
- BARBUTO, M., GALIMBERTI, A., FERRI, E., LABRA, M., MALANDRA, R., GALLI, P., & CASIRAGHI, M. (2010). **DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.).** *Food Research International*, 43(1), 376–381.

BEHS, G. (2011). **Efeito do processamento na composição centesimal e na análise sensorial de salmão selvagem e de cativoiro.** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BÉNARD-CAPELLE J, GUILLONNEAU V, NOUVIAN C, FOURNIER N, LE LOËT K, DETTAI A. (2015) **Fish mislabelling in France: substitution rates and retail types.** Peer Journal 2:e714

BJERKENG, B. (2000). **Carotenoid pigmentation of salmonid fishes - recent progress.** Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. (19-22), 71–89.

BOLD Systems – BARCODE OF LIFE DATABASE, **Identification.** Disponível em: <<http://www.blodsystems.org>>. Acessado em: 04 mai. 2015.

BRITO, M. A. (2013). **Uso do código de barras do DNA (COI) para avaliar a autenticidade da rotulagem de filés de pescada branca (*Sciaenidae*) comercializados em supermercados de Belém-PA.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará.

CALCAGNOTTO, D., SCHAEFER, S. A., & DESALLE, R. (2005). **Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences.** Molecular Phylogenetics and Evolution, 36(1), 135–153.

CARVALHO, D. C., PALHARES, R. M., DRUMMOND, M. G., & FRIGO, T. B. (2014). **DNA barcoding identification of commercialized seafood in south Brazil: a governmental regulatory forensic program.** Food Control, 50, 784–788.

CARVALHO, D. C., NETO, D. A. P., BRASIL, B. S. A. F., & OLIVEIRA, D. A. A. (2011). **DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil.** Mitochondrial DNA, 22(S1), 97–105.

CARVALHO, D. DE, SEERIG, A., MELO, D. C. DE, SOUSA, A. B. DE, PIMENTA, D., & OLIVEIRA, D. A. A. (2008). **Identificação**

molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). Revista Brasileira Reprodução Animal, 32, 215–219.

CAWTHORN, D. M., STEINMAN, H. A., & WITTHUHN, R. C. (2012). **DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market.** Food Research International, 46(1), 30–40.

CHIACHIO, M. C. (2009). **Estudos Filogenéticos na Subfamília Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae) com Base em Sequências de DNA.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista.

DE BRITO, M. A., SCHNEIDER, H., SAMPAIO, I., & SANTOS, S. (2015). **DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (*Sciaenidae*) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*).** Food Research International, 70, 40–46.

EC 104/2000. EC/ Defra. (2013). **Guidance Notes on Fish Labelling legislation The Fish Labelling Regulations 2012. Regulations (EC) 104/2000, 2065/2001, 1224/2009 and 404/2011,** (September).

EC 2065/2001. EC/ Defra. (2013). **Guidance Notes on Fish Labelling legislation The Fish Labelling Regulations 2012. Regulations (EC) 104/2000, 2065/2001, 1224/2009 and 404/2011,** (September).

FDA. Food and Drug Administration (2015). **DNA-based seafood identification.** Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/dnaseafoodidentification/default.htm>>. Acessado em: 04 mai. 2015.

FERGUSON, A. (1995). **Population and conservation.** Journal of Fish Biology, 47, 103–126.

FIGUEROA, D., MACCHI, G., & HAIMOVICHI, M. (2010). **News about the reproductive ecology of the southern conger eel *Conger***

orbignianus. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 90(November 2000), 461–465.

FILONZI, L., CHIESA, S., VAGHI, M., & NONNIS MARZANO, F. (2010). **Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy**. Food Research International, 43(5), 1383–1388.

FISHBASE. Disponível em: < <http://www.fishbase.org/>>. Acessado em 23 abr. 2015.

FREITAS, R. H. A. DE. (2013). **Análise da Biodiversidade e propostas de conservação de tubarões e raias da costa de São Paulo (Província Argentina) utilizando marcadores genéticos**. Universidade Estadual Paulista.

GALIMBERTI, A., DE MATTIA, F., LOSA, A., BRUNI, I., FEDERICI, S., CASIRAGHI, M., MARTELOS, S., LABRA, M. (2013). **DNA barcoding as a new tool for food traceability**. Food Research International, 50(1), 55–63.

GENBANK. Disponível em:<blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Acessado em: 04 mai. 2015.

GERHARDINGER, L. C., MARENZI, R. C., HOSTIM-SILVA, M., & MEDEIROS, R. P. (2006). **Conhecimento ecológico local de pescadores da Baía Babitonga, Santa Catarina, Brasil: Peixes da família Serranidae e alterações no ambiente marinho**. Acta Scientiarum - Biological Sciences, 28(3), 253–261.

GOVERNO DE SANTA CATARINA – Agricultura e Pesca (2014). **Pesquisa sobre pesca industrial consolida SC como maior produtora de pescados de origem marinha do país**. Disponível em: <<http://www.sc.gov.br/mais-sobre-agricultura-e-pesca/6233-boletins-estatisticos-da-pesca-industrial-consolidam-santa-catarina-como-maior-produtor-de-pescados-de-origem-marinha-do-pais>>. Acessado em: 04 mai. 2015.

HANNER, R., BECKER, S., IVANOVA, N. V., & STEINKE, D. (2011). **FISH-BOL and seafood identification: Geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada.** *Mitochondrial DNA*, 22(S1), 106–122.

HEBERT, P. D. N., CYWINSKA, A., BALL, S. L., & DEWAARD, J. R. (2003). **Biological identifications through DNA barcodes.** *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1512), 313–321.

HEBERT, P. D. N., PENTON, E. H., BURNS, J. M., JANZEN, D. H., & HALLWACHS, W. (2004). **Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), 14812–14817.

IUCN – **União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais.** Disponível em: <<http://www.iucn.org/>>. Acessado em: 04 mai. 2015.

JACKSON, J. B., KIRBY, M. X., BERGER, W. H., BJORN DAL, K. A., BOTSFORD, L. W., BOURQUE, B. J., BRADBURY, R. H., COOKE, R., ERLANDSON, J., ESTES, J. A., HUGHES, T. P., KIDWELL, S., LANGE, C. B., LENIHAN, H. S., PANDOLFI, J. M., PETERSON, C. H., STENECK, R. S., TEGNER, M. J., WARNER, R. R. (2001). **Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems.** *Science (New York, N.Y.)*, 293(5530), 629–637.

JOHN, S. W., WEITZNER, G., ROZEN, R., & SCRIVER, C. R. (1991). **A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes.** *Nucleic Acids Research*, 19(2), 408.

LAHIRI, D. K., & NURNBERGER, J. I. (1991). **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** *Nucleic Acids Research*, 19(19), 5444.

MAPA – 2005. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Instrução Normativa Nº 22**, de 24 de Novembro de 2005.

MELO, B. F., BENINE, R. C., MARIGUELA, T. C., & OLIVEIRA, C. (2011). **A new species of *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Characiformes, Characidae, Tetragonopterinae) from the upper rio Araguaia Central Brazil.** *Zootaxa*, 9(2911), 50–56.

MENDONÇA, F.F.; HASHIMOTO, D.T.; SILVÉRIO, J.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; GADIG, O. B. F.; FORESTI, F. (2008). **Identificação genética de tubarões: monitoramento da pesca e conservação.** Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética.

MPA – 2014. Ministério da Pesca e Agricultura. **Pesca Industrial.** Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/pesca/industrial>>. Acessado em: 04 mai. 2015.

MIYA, M., & NISHIDA, M. (2000). **Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17(3), 437–455.

MMA. (2014). **Portaria MMA no 445, de 17 de dezembro de 2014.**

MMA (2015). **Portaria MMA Nº163, de 08 de junho de 2015.**

NETO, D. A. P. (2013). **Deteccção de adulteração de espécies em pescado e derivados por meio da técnica de DNA *Barcoding*.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais.

PALUMBI, S. R. (1996). **What can molecular genetics contribute to marine biogeography? An urchin's tale.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 203(1), 75–92.

PEREIRA, S. L. (2000). **Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics.** *Genetics and Molecular Biology*, 23(4), 745–752.

- RATNASINGHAM, S., & HEBERT, P. D. N. (2007). **BOLD: The barcode of life data system**. *Molecular Ecology Notes*, 7, 355-367.
- ROBERTS, C. M. (2003). **Our shifting perspectives on the oceans**. *Cambridge*, 37(2), 166–177.
- ROSA, R. S., & GADIG, O. B. F. (2014). **Conhecimento da Diversidade dos Chondrichthyes Marinhos no Brasil: A Contribuição de José Lima de Figueiredo**. *Arquivos de Zoologia*, 45, 89–104.
- ROSA, R. S., & LIMA, F. C. T. (2008). **Peixes**. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*, 9–278.
- SAMPAIO, L. A., & BIANCHINI, A. (2002). **Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryaline flounder *Paralichthys orbignianus***. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269(2), 187–196.
- SEAFOOD BRASIL. (2014) **Santa Catarina é o maior produtor de pescado de origem marinha**. Disponível em: <<http://seafoodbrasil.com.br/santa-catarina-e-o-maior-produtor-de-pescado-de-origem-marinha-pais-diz-pequisa/>>. Acessado em: 04 mai. 2015.
- SEVERO, C. M. (2008). **Pesca Artesanal Em Santa Catarina: Evolução E Diferenciação Dos Pescadores Da Praia Da Pinheira**. *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*.
- SMITH, P. J., MCVEAGH, S. M., & STEINKE, D. (2008). **DNA barcoding for the identification of smoked fish products**. *Journal of Fish Biology*, 72(2), 464–471.
- SOUZA, C. H. S. (2000). **O homem da ilha e os pioneiros da caça submarina**. 2a ed. Editora Dehon. 352 páginas.
- TIMI, J. T., LUQUE, J. L., & SARDELLA, N. H. (2005). **Parasites of *Cynoscion guatucupa* along South American Atlantic coasts:**

Evidence for stock discrimination. Journal of Fish Biology, 67(6), 1603–1618.

UNESPCIÊNCIA. 2014. **O mar não está para atum.** Disponível em: <<http://www2.unesp.br/revista/?p=7418>>. Acessado em: 04 mai. 2015.

VALE, N. A. DO. (2008). **Interacções predador-presa entre o safio, *Conger conger*, e as suas presas: implicações na conservação.** Mestrado, Universidade de Lisboa, Portugal.

WARNER, K., TIMME, W., & LOWELL, B. (2012). **Widespread Seafood Fraud Found in New York City.** Oceana, (December), 1–17.

WONG, E. H. K., & HANNER, R. H. (2008). **DNA barcoding detects market substitution in North American seafood.** Food Research International, 41(8), 828–837.